



①9 BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENT- UND  
MARKENAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**  
⑩ **DE 101 14 999 A 1**

⑦1 Aktenzeichen: 101 14 999.9  
⑦2 Anmeldetag: 26. 3. 2001  
④3 Offenlegungstag: 10. 10. 2002

⑤1 Int. Cl.<sup>7</sup>:  
**C 12 N 9/86**  
C 12 N 15/55  
C 12 N 15/63  
C 12 N 1/21  
C 12 P 13/04  
C 12 Q 1/68  
C 07 H 21/04

DE 101 14 999 A 1

⑦1 Anmelder:  
Degussa AG, 40474 Düsseldorf, DE

⑦2 Erfinder:  
Drauz, Karlheinz, Prof., 63579 Freigericht, DE; May,  
Oliver, Dr., 60388 Frankfurt, DE; Bommarius,  
Andreas, Prof. Dr., Atlanta, Ga., US; Sylatk,  
Christoph, Prof. Dr., 70565 Stuttgart, DE;  
Altenbuchner, Josef, Dr., 71154 Nufringen, DE;  
Siemann-Herzberg, Martin, Dr., 72218 Wildberg,  
DE; Werner, Markus, 74189 Weinsberg, DE

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑤4 D-Carbamoylase aus *Arthrobacter crystallopoietes* DSM 20117

⑤7 Die vorliegende Erfindung ist auf eine neue D-Carbamoylase und die hierfür codierenden Gensequenzen aus dem Organismus *Arthrobacter crystallopoietes* DSM 20117 gerichtet. Weiteres sind Plasmide, Vektoren, Mikroorganismen, bestimmte Primer und spezielle Verwendungsmöglichkeiten der erfindungsgemäßen Enzyme erwähnt. Darüber hinaus beschreibt die Erfindung ein neues Verfahren zum Auffinden von Enzymen, die in einem Verfahren zur Herstellung von D-Aminosäuren, ausgehend von 5'-substituierten Hydantoinen, eingesetzt werden können.

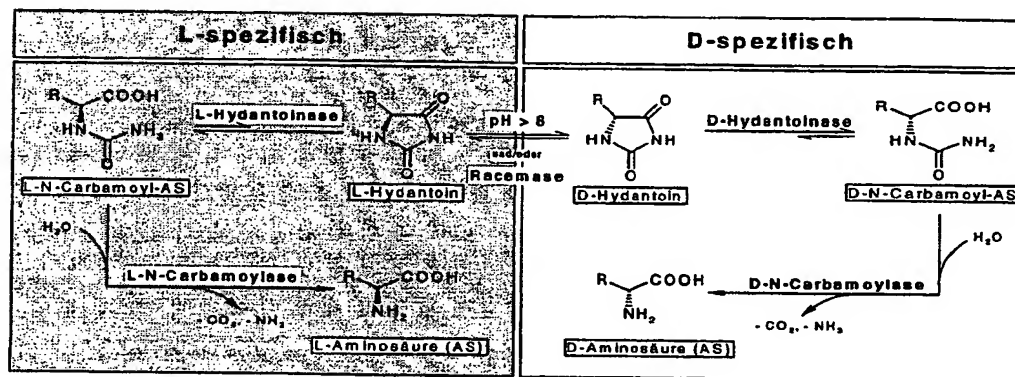
DE 101 14 999 A 1

[0001] Die vorliegende Erfindung ist auf eine D-Carbamoylase, dieses Enzym codierende Gensequenzen und deren Verwendung gerichtet. Weiterhin betrifft die Erfindung mit der D-Carbamoylase modifizierte Plasmide, Vektoren und Mikroorganismen, sowie ein Verfahren zum Auffinden eines chromosomal codierten Gens.

[0002] Der Einsatz enzymatischer Verfahren in der Synthese von organischen Verbindungen ist gerade im großtechnischen Maßstab von Vorteil, da sie in Bezug auf die Selektivitäten und Ausbeuten an Produkten den normalen chemischen Verfahren häufig überlegen sind. Gerade enantiomerenangereicherte Aminosäuren sind bevorzugte Targets für den Einsatz enzymatischer Verfahren, spielen diese Prozesse doch auch in der Natur eine entscheidende Bedeutung z. B. bei der Biosynthese von Proteinen und Eiweißen. Enantiomerenangereicherte Aminosäuren sind weiterhin wichtige Produkte im Hinblick auf die Synthese bioaktiver Verbindungen oder bei der parenteralen Ernährung.

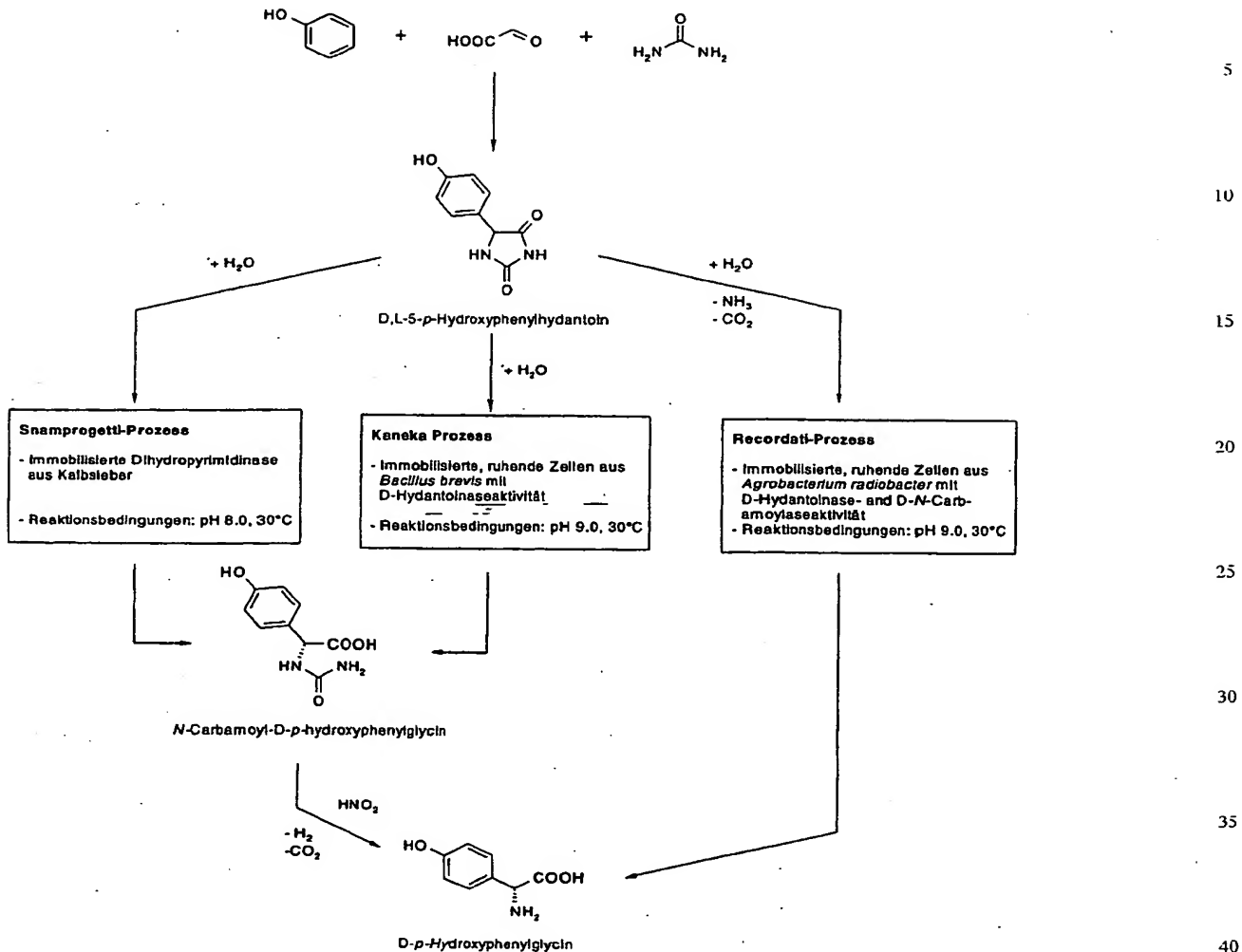
[0003] Carbamoylasen sind Enzyme, welche befähigt sind, N-Carbamoylamino-säuren stereoselektiv in die L- oder D-Aminosäure unter Zurückbehalt der enantiomeren Carbamoylamino-säure umzusetzen (Schema 1).

Schema 1



[0004] Die racemischen N-Carbamoylamino-säuren lassen sich vorzugsweise recht einfach mittels Hydantoinasen aus Hydantoinen oder durch Umsetzung von Aminosäuren mit KOCN gewinnen, weshalb derartige Verfahren zur Herstellung von enantiomerenangereicherten Aminosäuren im technischen Maßstab Anwendung finden (Drauz K, Kottenhahn M, Makryaleas K, Klenk H, Bernd M, Angew Chem, (1991). Chemoenzymatic synthesis of D- $\alpha$ -ureidoaminoacids, 103, 704-706.; Schema 2).

Schema 2



[0005] D-Carbamoylasen sind aus der Literatur schon einige bekannt (Syldatk et al. in "Enzymatic Catalysis in Organic Synthesis", Eds.: Drauz, Waldmann, VCH, 1<sup>st</sup> und 2<sup>nd</sup> Ed.), doch arbeiten diese zumeist wenig effizient oder sind instabil (Syldatk C, Müller R, Pietzsch M, Wagner F (1992). Biocatalytic production of amino acids & derivatives; eds.: Rozzell D, Wagner F) Hanser Publishers, München; 129-176; Louwrier A, Knowles CJ (1996). The purification and characterization of a novel D-specific carbamoylase enzyme from *Agrobacterium* sp. *Enzyme Microb Technol.* 19; 562-571; Nanba H, Ikenaka Y, Yamada Y, Yajima K, Takano M, Takahashi S (1998). Isolation of *Agrobacterium* sp. strain KNK712 that produces N-carbamyl-D-amino acid amidohydrolase, cloning of the gene for this enzyme, and properties of the enzyme. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 62 (5) 875-881; Kim DM, Kim GJ, Kim HS (1994). *Biotechnol Lett.* (16) 11-16), weshalb immer noch ein Bedarf an weiteren verbesserten Carbamoylasen besteht.

[0006] Aufgabe der vorliegenden Erfindung war demnach die Bereitstellung weiterer ggf. gegenüber dem Stand der Technik verbesserter Carbamoylasen.

[0007] Die Aufgabe wird anspruchsgemäß gelöst. Anspruch 1 schützt die neue D-Carbamoylase aus *A. crystallopoietes* DSM 20117. Anspruch 2 richtet sich auf die Gensequenzen, welche für die erfindungsgemäße D-Carbamoylase codieren, Anspruch 3 betrifft mit diesen Gensequenzen modifizierte Plasmide und Vektoren, während Anspruch 4 auf einen vorteilhaften erfindungsgemäß modifizierten Mikroorganismus gerichtet ist. Anspruch 5 richtet sich auf bestimmte Primer, wohingegen Ansprüche 6 bis 8 vorteilhafte Verwendungen der erfindungsgemäßen D-Carbamoylasen unter Schutz stellen. In den Ansprüchen 9 bis 11 wird ein Verfahren zum Auffinden von Genen beschrieben.

[0008] Durch die Bereitstellung der D-Carbamoylase aus *Arthrobacter crystallopoietes* DSM 20117 (Seq. 2) erhält man die Möglichkeit diese vorteilhaft in einem Verfahren zur Herstellung von Aminosäuren einzusetzen. Solche Verfahren sind dem Fachmann im Prinzip bekannt (WO 0058449, WO 0008374, DE 100 050 123.0 oder DE 100 50 124.9 sowie dort zitierte Literatur).

[0009] Das Enzym kann als natives Enzym oder vorteilhaft in Form der rekombinant hergestellten Verbindung zu den beschriebenen Verfahren herangezogen werden. Die Herstellung der erfindungsgemäßen rec-Enzyme erfolgt nach dem Fachmann bekannten gentechnologischen Verfahren (Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989). *Molecular Cloning*. Cold Spring Harbour Laboratory Press; Vectors: A Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses. R. L. Rodriguez & D. T. Denhardt, Eds: 205-225). Bezüglich der allgemeinen Vorgehensweise (PCR und Fusions-PCR, inverse PCR, Klonierung, Expression etc.) sei auf folgende Literatur und das dort zitierte verwiesen: Riley J, Butler R, Finnear R, Jenner D, Powell S, Anand R, Smith JC, Markham AF (1990). A novel, rapid method for the isolation of terminal se-

quences from yeast artificial chromosome (YAC) clones. Nucl Acids Res. 18, 8186; Triglia T, Peterson MG, Kemp DJ (1988). A procedure for in vitro amplification of DNA segments that lie outside the boundaries of known sequences. Nucleic Acids Res. 16, 8186; Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989). Molecular Cloning. Cold Spring Harbour Laboratory Press; Vectors: A Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses. R. L. Rodriguez & D. T. Denhardt, II).

[0010] In einer weiteren Ausgestaltung beschäftigt sich die Erfindung mit Gensequenzen codierend für die erfindungsgemäßen D-Carbamoylase (z. B. Seq. 1). Gensequenzen, welche für Aminosäuresequenzen codieren, umfassen alle Sequenzen, die nach Maßgabe der Degeneration des genetischen Codes möglich erscheinen.

[0011] Ein nächster Aspekt der Erfindung beschäftigt sich mit Plasmiden oder Vektoren aufweisend die erfindungsgemäßen Gensequenzen.

[0012] Als Plasmide oder Vektoren kommen im Prinzip alle dem Fachmann für diesen Zweck zur Verfügung stehenden Ausführungsformen in Frage. Derartige Plasmide und Vektoren können Studier et al., Methods Enzymol. 1990, 185, 61-69 oder den Broschüren der Firmen Novagen, Promega, New England Biolabs, Clontech oder Gibco BRL entnommen werden. Weiter bevorzugte Plasmide und Vektoren können gefunden werden in: DNA cloning: a practical approach. Volume I, III, edited by D. M. Glover, IRL Press Ltd., Oxford, Washington DC, 1985, 1987; Denhardt, D. T. and Colasanti, J.: A survey of vectors for regulating expression of cloned DNA in E. coli. In: Rodriguez, R. L. and Denhardt, D. T. (eds), Vectors, Butterworth, Stoneham, MA, 1987, pp 179-204; Gene expression technology. In: Goeddel, D. V. (eds), Methods in Enzymology. Volume 185, Academic Press, Inc., San Diego, 1990; Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, 2<sup>nd</sup> ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.

[0013] Plasmide, mit denen das die erfindungsgemäße Gensequenz aufweisende Genkonstrukt in ganz bevorzugter Weise in den Wirtsorganismus kloniert werden kann, sind: pKK-177-3H (Roche Biochemicals), pBTac (Roche Biochemicals), pKK-233 (Stratagene) oder pET (Novagen). Mit Ausnahme der TOPO-Serie, die eine Kanamycin-Resistenz integriert hat, sollten alle anderen Plasmide eine  $\beta$ -Lactamase für die Ampicillin-Resistenz enthalten. Äußerst bevorzugte Plasmide sind die folgenden:

Bezeichnung	Eigenschaften	beteiligte Primer
pJW2 (Fig. 1)	pCRTOPOBluntII mit Amplikon aus IPCR 1	IPCR1+/-
pRW (Fig. 2)	pCRTOPOBluntII mit Amplikon aus IPCR 2	IPCR5+/5-

[0014] Gleichfalls ist die Erfindung auf Mikroorganismen aufweisend die erfindungsgemäßen Gensequenzen gerichtet. Der Mikroorganismus, in den die Gensequenz kloniert wird, dient zur Vermehrung und Gewinnung einer ausreichenden Menge des rekombinanten Enzyms. Die Verfahren hierfür sind dem Fachmann wohl bekannt (Sambrook et al. 1989, Molecular cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Balbas P & Bolivar F. 1990, Design and construction of expression plasmid vectors in E. coli, Methods Enzymology 185, 14-37). Als Mikroorganismen können im Prinzip alle dem Fachmann für diesen Zweck in Frage kommenden Organismen herangezogen werden. Vorzugsweise sind E. coli-Stämme für diesen Zweck zu benutzen. Ganz besonders bevorzugt sind: E. coli NM 522, JM109, JM105, RR1, DH5 $\alpha$ , TOP 10<sup>-</sup> oder HB101. Plasmide, mit denen das die erfindungsgemäße Gensequenz aufweisende Genkonstrukt vorzugsweise in den Wirtsorganismus kloniert wird, sind weiter oben angegeben.

[0015] Ein folgender Aspekt der Erfindung richtet sich auf Primer zur Herstellung der erfindungsgemäßen Gensequenzen mittels aller Arten von PCR. Mitumfaßt sind die Sense- und Antisense-Primer codierend für die entsprechenden Aminosäuresequenz.

[0016] Geeignete Primer können prinzipiell nach dem Fachmann bekannten Verfahren gewonnen werden. Das Auffinden der erfindungsgemäßen Primer erfolgt durch Vergleich mit bekannten DNA-Sequenzen oder durch Übersetzung der ins Auge gefaßten Aminosäuresequenzen in das Codon des betrachteten Organismus (z. B. für Streptomyces: Wright et al., Gene 1992, 113, 55-65). Gemeinsamkeiten in der Aminosäuresequenz von Proteinen von sogenannten Superfamilien sind hierfür ebenfalls von Nutzen (Firestine et al., Chemistry & Biology 1996, 3, 779-783). Weitere Informationen diesbezüglich können gefunden werden in Oligonucleotide synthesis: a practical approach, edited by M. J. Gait, IRL Press Ltd, Oxford Washington DC, 1984; PCR Protocols: A guide to methods and applications, edited by M. A. Innis, D. H. Gelfound, J. J. Sninsky and T. J. White. Academic Press, Inc., San Diego, 1990. Äußerst bevorzugt sind folgende Primer:

Bez.	Sequenz	Seq.
IPCR1+	5'-GAT GTT CAC GCA CCT TCT TTC ACT TC -3'	3
IPCR1-	5'-GGT GTT GTA GCC CAG GAC GAC GAG C -3'	4
IPCR5+	5'-GAG GGC GAT GAA GTC GTC GTT GTG AA -3'	5
IPCR5-	5'-GTT CTG GTA TGC CCC TGC CTG AAG T -3'	6

## Primer für die Klonierung von Strukturgenen

Bez.	Sequenz	Seq.
K_DCn2	5'-AAC ATA TGG CGA AAA ACT TGA TGC TC-3'	7
K_DCc2	5'-AAG GAT CCG TCA TTC ACG TTG AAC GG -3'	8
K_DCc3	5'-AAG GAT CCT TAG TCA TTC ACG TTG AAC GG-3'	9

- [0017] Weitere Aspekte der Erfindung beschäftigen sich mit der Verwendungen der erfindungsgemäßen D-Carbamoylase. Im Prinzip kann diese in allen dem Fachmann in Frage kommenden Verfahren eingesetzt werden, z. B. zur Herstellung von enantiomer angereicherten Aminosäuren, die vorzugsweise in der parenteralen Ernährung oder Tierernährung eingesetzt werden können. Weiters vorzugsweise jedoch dienen die so hergestellten optisch angereicherten Aminosäuren zur Synthese bioaktiver Verbindungen. Verfahren zur Herstellung von enantiomerenangereicherten Aminosäuren sind u. a. solche Verfahren, welche in WO 0058449, WO 0008374, DE 100 050 123.0 oder DE 100 50 124.9 sowie der dort zitierten Literatur genannt sind. Mit der gegenständlichen D-Carbamoylase lassen sich diese völlig analog durchführen.
- [0018] Vorzugsweise werden die eben genannten Verfahren zur Herstellung von Aminosäuren ausgehend von Hydantoinen im System Hydantoinase/D-Carbamoylase ggf. in Gegenwart einer Hydantoinracemase oder einem zur Racemisierung von Carbamoylaminosäuren befähigten Enzym durchgeführt (WO 0058449, WO 0008374). Besonders bevorzugt erfolgt der erfindungsgemäße Prozeß in einem Enzym-Membran-Reaktor (DE 199 10 691.6).
- [0019] Die erfindungsgemäße Carbamoylase kann in einer weiteren Verwendung zur Herstellung gentechnisch veränderter Enzyme herangezogen werden. Solche Verfahren sind dem Fachmann im Prinzip bekannt (Eigen M. and Gardinger W. (1984) Evolutionary molecular engineering based on RNA replication. Pure & Appl. Chem. 56 (8), 967-978; Chen & Arnold (1991) Enzyme engineering for nonaqueous solvents: random mutagenesis to enhance activity of subtilisin E in polar organic media. Bio/Technology 9, 1073-1077; Horwitz, M. And L. Loeb (1986) "Promoters Selected From Random DNA-Sequences" Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America 83 (19): 7405-7409; Dube, D. And L. Loeb (1989) "Mutants Generated By The Insertion Of Random Oligonucleotides Into The Active-Site Of The Beta-Lactamase Gene" Biochemistry 28 (14): 5703-5707; Stemmer PC (1994). Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling. Nature. 370; 389-391 und Stemmer PC (1994) DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: In vitro recombination for molecular evolution. Proc Natl Acad Sci USA. 91; 10747-10751).
- [0020] Der Stamm *Arthrobacter crystallopoietes* DSM 20117 wurde in der Doktorarbeit von A. Marin (Stuttgart, 1997) in Bezug auf die Umsetzung von Hydantoinderivaten untersucht. Es gelang aus ihm die D-Hydantoinase homogen aufzureinigen und die ersten 30 Aminosäuren des N-Terminus zu bestimmen. Eine chromatographische Aufreinigung einer D-Carbamoylase schlug allerdings fehl, da es sich hierbei offensichtlich um ein extrem instabiles Enzym handelt. Eine Klonierung der erfindungsgemäßen D-Carbamoylase konnte jedoch über den Umweg der Klonierung der D-Hydantoinase möglich gemacht werden. Durch den Einsatz der degenerierten PCR und inversen PCR, die die Existenz eines Hyu-Genclusters bestätigten, wurde die Gensequenz des D-Carbamoylasestrukturgenes aus DSM 20117 entschlüsselt. Anschließend wurde die rekombinante Produktion der D-Carbamoylase in *Escherichia coli* ermöglicht und das Genprodukt bezüglich seiner Funktion als neuartige D-Carbamoylase charakterisiert.
- [0021] Das genannte Enzym ggf. in Kombination mit weiteren Enzymen (z. B. Hydantoinase/Racemase s. WO 0058449, WO 0008374) kann in freier Form als homogen aufgereinigte Verbindungen oder als rekombinant hergestelltes Enzym verwendet werden. Weiterhin kann es auch als Bestandteil eines intakten (Gast-)Organismus eingesetzt werden oder in Verbindung mit der aufgeschlossenen und beliebig weit aufgereinigten Zellmasse des jeweiligen Wirtsorganismus. Möglich ist ebenfalls die Verwendung der Enzyme in immobilisierter Form (Bhavender P. Sharma, Lorraine F. Bailey and Ralph A. Messing, "Immobilisierte Biomaterialien - Techniken und Anwendungen", Angew. Chem. 1982, 94, 836-852).
- [0022] Vorteilhafterweise erfolgt die Immobilisierung durch Lyophilisation (Dordick et al. J. Am. Chem. Soc. 194,

116, 5009–5010; Okahata et al. *Tetrahedron Lett.* 1997, 38, 1971–1974; Adlercreutz et al. *Biocatalysis* 1992, 6, 291–305). Ganz besonders bevorzugt ist die Lyophilisation in Gegenwart von oberflächenaktiven Substanzen, wie Aerosol OT oder Polyvinylpyrrolidon oder Polyethylenglycol (PEG) oder Brij 52 (Diethylenglycol-mono-cetyler) (Goto et al. *Biotechnol. Techniques* 1997, 11, 375–378). Die Verwendung als CLECs ist ebenfalls denkbar (Vaghjiani et al., *Bio-cat. Biotransform.* 2000, 18, 157ff).

[0023] Wie die Ergebnisse der Umsetzungen der N-Carbamoylaminosäuren mit D-Carbamoylase zeigen, lassen sich eine Reihe von verschiedenen Substraten erfolgreich umsetzen. Herausragend ist dabei die Aktivität des erfindungsgemäßen Enzyms in Bezug auf Alanin. Die D-Carbamoylase aus *Arthrobacter crystallopoietes* DSM 20117 besitzt eine maximale Aminosäure-Identität von 53% zu den bisher beschriebenen D-Carbamoylasen.

[0024] In einer nächsten Ausgestaltung bezieht sich die Erfindung auf ein Verfahren zum Auffinden eines chromosomal codierten Gens, welches für ein Enzym codiert, das in einem Verfahren zur Herstellung von D-Aminosäuren aus 5'-substituierten Hydantoinen mitwirken kann, wobei man

- a) chromosomale DNA eines Organismus, welcher befähigt ist, D-Aminosäuren aus 5'-substituierten Hydantoinen herzustellen, in Bruchstücke teilt,
- b) diese anschließend in Plasmide kloniert,
- c) die Plasmide mit Oligonucleotiden hybridisiert, welche die Sequenzinformation einer Hydantoinase oder einer D-Carbamoylase aufweisen,
- d) ausgehend von der erfolgreichen Hydantoinase-Hybridisierung D-Carbamoylasesequenzen oder im Falle der erfolgreichen D-Carbamoylase-Hybridisierung Hydantoinasesequenzen im gleichen Plasmid identifiziert.

[0025] Mittels der so identifizierten Sequenzen lassen sich nach dem Fachmann bekannten Verfahren die entsprechend codierten Enzyme herstellen. Vorzugsweise gelangt man über diese Strategie zu den hier beschriebenen erfindungsgemäßen Enzymen.

[0026] Das beschriebene Verfahren kann in all den Fällen erfolgreich angewandt werden, in denen zum einen native Enzyme durch Aufreinigung nur schwer oder gar nicht zu isolieren sind und zum anderen die Organisation von an der betrachteten Reaktion beteiligten Enzymen vergesellschaftet, z. B. auf einem Operon, vorliegt. Die Organisation von D-Hydantoinasen und D-Carbamoylasen in einem Operon wurde bereits unter anderem in der Doktorarbeit von Martin Hils (Stuttgart, 1998) beschrieben. Die identifizierten Operons von *Agrobacterium* sp. IP I-671 und *Agrobacterium radiobacter* NRRL B11291 entstammen dabei nicht chromosomaler DNA, sondern sind auf natürlich vorkommenden oftmals schwer zu isolierenden Plasmiden der jeweiligen Organismen lokalisiert. Dasselbe gilt auch für *Pseudomonas* sp. NS671, bei welchem die Enzyme für einen L-selektiven Hydantoin-Abbaupfad auf dessen natürlich vorkommenden Plasmid kodiert sind (Watabe, K.; Ishiwaka, T.; Nakamura, H. 1992, Cloning and sequencing of the genes involved in the conversion of 5-substituted hydantoins to the corresponding L-amino acids from the native plasmid of *Pseudomonas* sp. NS671, *J. Bacteriol.* 174: 962–969). Die beschriebene Verwendung chromosomaler DNA zum Auffinden solcher D-selektiver Enzyme ist daher nicht naheliegend. Vielmehr würde man bevorzugt plasmidische DNA der entsprechenden Organismen als Ausgangsmaterial für die Klonierung eines D-selektiven Hydantoinase-Carbamoylaseoperons verwenden. Es ist daher überraschend, dass ausgehend von einer Sequenzinformation für eine D-Hydantoinase eine chromosomale D-Carbamoylase gefunden werden konnte. Diese Erkenntnis kann nun technisch so genutzt werden, dass die Sequenzinformation einer Hydantoinase, oder deren Aktivität, zur Isolation einer D-Carbamoylase aus einfach zu isolierender chromosomaler DNA (auch aus Bodenproben), verwendet werden kann. Ebenso kann die Kenntnis über eine D-Carbamoylasesequenz oder deren Aktivität zur Isolation einer D-Hydantoinase aus chromosomaler DNA genutzt werden.

[0027] Das erfindungsgemäße Verfahren geht dabei von chromosomaler DNA eines zur Umwandlung von 5'-substituierten Hydantoinen in D-Aminosäuren befähigten Organismus aus. Diese wird nach dem Fachmann bekannten Techniken in Bruchstücke zerlegt (der Restriktionsverdau erfolgt dabei z. B. nach den Angaben des Herstellers der Restriktionskits [Roche Diagnostics]). Anschließend werden die DNA-Bruchstücke analog bekannter Maßnahmen in geeignete Plasmide kloniert (Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989). *Molecular Cloning*. Cold Spring Harbour Laboratory Press). Als geeignet können die weiter oben genannten Plasmide angesehen werden. Die Hybridisierung der Plasmid-DNA mit der DNA eines geeigneten Enzyms gelingt wiederum nach dem Fachmann bekannten Hybridisierungstechniken (Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989). *Molecular Cloning*. Cold Spring Harbour Laboratory Press), wobei die erfolgreiche Hybridisierung z. B. mittels DNA-Amplifikation (PCR), einer Markierung (Fluoreszenz, Radioaktivität) der Oligonucleotide oder mittels Expressionslibraries und Aktivitätsdetektion erfolgen kann. Ausgehend von einem Hybridisierungssignal werden die benachbarten Bereiche beispielsweise über IPCR (Genetic applications of an inverse polymerase chain reaction, Ochman H, Gerber A S, Hartl D L, *GENETICS* (1988 Nov), 120 (3), 621–3; The polymerase chain reaction, Arnheim, Norman, *Genet. Eng. (N. Y.)* (1990), 12 115–37) des bekannten, hybridisierten Gens über herkömmliche DNA-Sequenzierung und Sequenzvergleich oder Aktivitätsnachweis im Hinblick auf das Vorhandensein einer D-Hydantoinase oder D-Carbamoylase identifiziert und analysiert. Dies geschieht ebenfalls nach dem Fachmann geläufigen Methoden, d. h. über die DNA-Sequenzierung und die Analyse der DNA-Sequenz durch entsprechende Programme wie z. B. dem GCG-Programm (s. a. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Joseph Sambrook and David W. Russell, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2000).

[0028] Unter optisch angereicherten (enantiomerenangereicherten, enantiomer angereicherten) Verbindungen wird im Rahmen der Erfindung das Vorliegen einer optischen Antipode im Gemisch mit der anderen in > 50 mol-% verstanden.

[0029] Unter Hydantoinen sind die sich aus 2,4-Dioximidazolidinen ableitenden Verbindungen gemeint, welche in 5-Stellung durch einen Rest substituiert sind, der sich von dem  $\alpha$ -Rest einer Aminosäuren ableiten läßt.

[0030] Unter  $\alpha$ -Rest einer Aminosäure wird der am  $\alpha$ -C-Atom einer  $\alpha$ -Aminosäure befindliche Rest verstanden. Dieser kann sich von einer natürlichen Aminosäure, wie in Beyer-Walter, Lehrbuch der organischen Chemie, S. Hirzel Verlag Stuttgart, 22. Auflage, 1991, S. 822f. dargestellt, ableiten. Darüberhinaus sind jedoch auch entsprechende  $\alpha$ -Reste unnatürlicher  $\alpha$ -Aminosäuren gemeint wie z. B. in DE 199 03 268.8 aufgeführt.

[0031] Der Organismus *Arthrobacter crystallopoietes* DSM 20117 ist bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen unter der entsprechenden Nummer hinterlegt und öffentlich zugänglich.

[0032] Mit der Angabe des erfindungsgemäßen Enzyms ist sowohl das native homogen aufgereinigte wie auch das entsprechende rekombinant hergestellte Enzym gemeint. Mitumfaßt sind auch alle weiteren Enzyme mit bezüglich den reaktionsbeeinflussenden Sequenzen gleicher Peptidsequenz und gleicher Aktivität, welche jedoch modifiziert wurden, z. B. His-tag-modifizierte Enzyme oder startcodonmodifizierte Enzyme etc.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

## SEQUENZPROTOKOLL

<110> Degussa-Hüls Aktiengesellschaft

<120> D-Carbamoylase aus *Arthrobacter crystallopoietes*

<130> 000753 AM

<140>

<141>

<160> 13

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 948

<212> DNA

<213> *Arthrobacter crystallopoietes*

<220>

<221> CDS

<222> (1) .. (948)

<400> 1

atg gcg aaa aac ttg atg ctc gcg gtc gct caa gtc ggc ggt atc gat 48

Met Ala Lys Asn Leu Met Leu Ala Val Ala Gln Val Gly Gly Ile Asp

1

5

10

15

agt tcg gaa tca aga ccc gaa gtc gtc gcc cgc ttg att gcc ctg ctg 96

Ser Ser Glu Ser Arg Pro Glu Val Val Ala Arg Leu Ile Ala Leu Leu

20

25

30

gaa gaa gca gct tcc cag ggc gcg gaa ctg gtg gtc ttt ccc gaa ctc 144

Glu Glu Ala Ala Ser Gln Gly Ala Glu Leu Val Val Phe Pro Glu Leu

35

40

45

acg ctg acc acg ttc ttc ccg cgt acc tgg ttc gaa gaa ggc gac ttc 192

Thr Leu Thr Thr Phe Phe Pro Arg Thr Trp Phe Glu Glu Gly Asp Phe



# DE 101 14 999 A 1

50

55

60

gag gaa tac ttc gat aaa tcc atg ccc aat gac gac gtc gcg ccc ctt 240  
 Glu Glu Tyr Phe Asp Lys Ser Met Pro Asn Asp Asp Val Ala Pro Leu  
 65 70 75 80

5

ttc gaa cgc gcc aaa gac ctt ggc gtg ggc ttc tac ctc gga tac gcg 288  
 Phe Glu Arg Ala Lys Asp Leu Gly Val Gly Phe Tyr Leu Gly Tyr Ala  
 85 90 95

10

15

gaa ctg acc agt gat gag aag cgg tac aac aca tca att ctg gtg aac 336  
 Glu Leu Thr Ser Asp Glu Lys Arg Tyr Asn Thr Ser Ile Leu Val Asn  
 100 105 110

20

aag cac ggc gac atc gtc ggc aag tac cgc aag atg cat ctg ccg ggc 384  
 Lys His Gly Asp Ile Val Gly Lys Tyr Arg Lys Met His Leu Pro Gly  
 115 120 125

25

cac gcc gat aac cgg gaa gga cta ccc aac cag cac ctt gaa aag aaa 432  
 His Ala Asp Asn Arg Glu Gly Leu Pro Asn Gln His Leu Glu Lys Lys  
 130 135 140

30

35

tac ttc cgc gaa gga gat ctc gga ttc ggt gtc ttc gac ttc cac ggc 480  
 Tyr Phe Arg Glu Gly Asp Leu Gly Phe Gly Val Phe Asp Phe His Gly  
 145 150 155 160

40

gtg cag gtc gga atg tgt ctc tgc aac gac cgg cga tgg ccg gag gtc 528  
 Val Gln Val Gly Met Cys Leu Cys Asn Asp Arg Arg Trp Pro Glu Val  
 165 170 175

45

tac cgc tct ttg gcc ctg cag gga gca gag ctc gtc gtc ctg ggc tac 576  
 Tyr Arg Ser Leu Ala Leu Gln Gly Ala Glu Leu Val Val Leu Gly Tyr  
 180 185 190

50

55

aac acc ccc gat ttc gtt ccc ggc tgg cag gaa gag cct cac gcg aag 624  
 Asn Thr Pro Asp Phe Val Pro Gly Trp Gln Glu Glu Pro His Ala Lys  
 195 200 205

60

atg ttc acg cac ctt ctt tca ctt cag gca ggc gca tac cag aac tcg 672

65

# DE 101 14 999 A 1

Met Phe Thr His Leu Leu Ser Leu Gln Ala Gly Ala Tyr Gln Asn Ser  
210 215 220

gta ttt gtg gcg gct gcc ggc aag tcg ggc ttc gaa gac ggg cac cac 720  
Val Phe Val Ala Ala Ala Gly Lys Ser Gly Phe Glu Asp Gly His His

225 230 235 240

atg atc ggc gga tca gcg gtc gcc gcg ccc agc ggc gaa atc ctg gca 768  
Met Ile Gly Gly Ser Ala Val Ala Ala Pro Ser Gly Glu Ile Leu Ala

245 250 255

aaa gca gcc ggc gag ggc gat gaa gtc gtc gtt gtg aaa gca gac atc 816  
Lys Ala Ala Gly Glu Gly Asp Glu Val Val Val Val Lys Ala Asp Ile

260 265 270

gac atg ggc aag ccc tat aag gaa agc gtc ttc gac ttc gcc gcc cat 864  
Asp Met Gly Lys Pro Tyr Lys Glu Ser Val Phe Asp Phe Ala Ala His

275 280 285

cgg cgc ccc gac gca tac ggc atc atc gcc gaa agg aaa ggg cgg ggc 912  
Arg Arg Pro Asp Ala Tyr Gly Ile Ile Ala Glu Arg Lys Gly Arg Gly

290 295 300

gcc cca ctg ccc gtc ccg ttc aac gtg aat gac taa 948

Ala Pro Leu Pro Val Pro Phe Asn Val Asn Asp  
305 310 315

<210> 2

<211> 315

<212> PRT

<213> Arthrobacter crystallopoietes

<400> 2

Met Ala Lys Asn Leu Met Leu Ala Val Ala Gln Val Gly Gly Ile Asp

1 5 10 15

Ser Ser Glu Ser Arg Pro Glu Val Val Ala Arg Leu Ile Ala Leu Leu

20 25 30

Glu Glu Ala Ala Ser Gln Gly Ala Glu Leu Val Val Phe Pro Glu Leu

35	40	45	
Thr Leu Thr Thr Phe Phe Pro Arg Thr Trp Phe Glu Glu Gly Asp Phe			
50	55	60	5
Glu Glu Tyr Phe Asp Lys Ser Met Pro Asn Asp Asp Val Ala Pro Leu			
65	70	75	80
Phe Glu Arg Ala Lys Asp Leu Gly Val Gly Phe Tyr Leu Gly Tyr Ala			10
85	90	95	
Glu Leu Thr Ser Asp Glu Lys Arg Tyr Asn Thr Ser Ile Leu Val Asn			
100	105	110	15
Lys His Gly Asp Ile Val Gly Lys Tyr Arg Lys Met His Leu Pro Gly			
115	120	125	
His Ala Asp Asn Arg Glu Gly Leu Pro Asn Gln His Leu Glu Lys Lys			20
130	135	140	
Tyr Phe Arg Glu Gly Asp Leu Gly Phe Gly Val Phe Asp Phe His Gly			
145	150	155	160
Val Gln Val Gly Met Cys Leu Cys Asn Asp Arg Arg Trp Pro Glu Val			25
165	170	175	
Tyr Arg Ser Leu Ala Leu Gln Gly Ala Glu Leu Val Val Leu Gly Tyr			
180	185	190	30
Asn Thr Pro Asp Phe Val Pro Gly Trp Gln Glu Glu Pro His Ala Lys			
195	200	205	35
Met Phe Thr His Leu Leu Ser Leu Gln Ala Gly Ala Tyr Gln Asn Ser			
210	215	220	
Val Phe Val Ala Ala Ala Gly Lys Ser Gly Phe Glu Asp Gly His His			
225	230	235	240
Met Ile Gly Gly Ser Ala Val Ala Ala Pro Ser Gly Glu Ile Leu Ala			40
245	250	255	
Lys Ala Ala Gly Glu Gly Asp Glu Val Val Val Val Lys Ala Asp Ile			45
260	265	270	
Asp Met Gly Lys Pro Tyr Lys Glu Ser Val Phe Asp Phe Ala Ala His			
275	280	285	50
Arg Arg Pro Asp Ala Tyr Gly Ile Ile Ala Glu Arg Lys Gly Arg Gly			
290	295	300	
Ala Pro Leu Pro Val Pro Phe Asn Val Asn Asp			55
305	310	315	
			60
			65

<210> 3  
 <211> 26  
 5 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz  
  
 10 <220>  
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Primer IPCR1+  
  
 15 <400> 3  
 gatgttcacg caccttcttt cacttc 26  
  
 20 <210> 4  
 <211> 25  
 <212> DNA  
 25 <213> Künstliche Sequenz  
  
 <220>  
 30 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Primer ICPR1-  
  
 <400> 4  
 35 ggtgttgtag cccaggacga cgagc 25  
  
 40 <210> 5  
 <211> 26  
 <212> DNA  
 45 <213> Künstliche Sequenz  
  
 <220>  
 50 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Primer IPCR5+  
  
 <400> 5  
 55 gagggcgatg aagtcgtcgt tgtgaa 26  
  
 60  
  
 65

<210> 6

<211> 25

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Primer IPCR5-

<400> 6

gttctggtat gcccctgcct gaagt

25

<210> 7

<211> 26

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Primer K\_DCn2

<400> 7

aacatatggc gaaaaacttg atgctc

26

<210> 8

<211> 26

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Primer K\_DCc2

<400> 8

aaggatccgt cattcacgtt gaacgg

26

<210> 9

<211> 29

5 <212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

10 <220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Primer K\_DCc3

15 <400> 9

aaggatcctt agtcattcac gttgaacgg

29

20 <210> 10

<211> 17

25 <212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

30 <220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Degenerierter  
Primer 61.61a

35 <400> 10

gtnatgtayg aracvvg

17

40

<210> 11

<211> 17

45 <212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

50 <220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Degenerierter  
Primer 73.31b

55

<400> 11

gtrtartcca trtttytc

17

60

65

<210> 12

<211> 13

<212> PRT

<213> Arthrobacter crystallopoietes

<400> 12

Ser Leu Val Met Tyr Glu Thr Gly Val Ala Glu Gly Lys

1

5

10

<210> 13

<211> 11

<212> PRT

<213> Arthrobacter crystallopoietes

<400> 13

Gln Asn Met Asp Tyr Thr Leu Phe Glu Gly Lys

1

5

10

# I. Biomassegewinnung von Arthrobacter crystallopoietes DSM 20117

[0033] Als Ausgangsmaterial für Ganzzellaktivitätstests, für die Isolierung chromosomaler DNA und zur Enzymisierung der D-Hydantoinase sollte zunächst eine physiologisch einheitliche Zellmasse von Arthrobacter crystallopoietes DSM 20117 in ausreichender Menge bereitgestellt werden. Nach den Arbeiten von Brans (Doktorarbeit, TU Braunschweig, 1991) wurde dafür ein halbsynthetisches Medium mit D,L-Lactat als Kohlenstoffquelle, Hefeextrakt als weiterem Bestandteil und Hydantoin als Induktor für die Kultivierung im 50 Liter-Bioreaktor verwendet:

Tabelle 1

Die Daten beziehen sich auf 1 l Nährlösung

Natriumlactat- Medium pH 7,2 (V = 1 Liter)	Zitronensäure	0,75 g
(Brans, 1991)	Hefeextrakt	1,0 g
	FeSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O	0,01 g
	MgSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O	0,5 g
	CaSO <sub>4</sub> * 2 H <sub>2</sub> O	0,22 g
	MnSO <sub>4</sub> * H <sub>2</sub> O	0,055 g
	ZnSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O	0,005 g
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	6,0 g
	D, L-Methionin	0,05 g
	Hydantoin	1,0 g
	50 %-iges D, L- Lactat	40 ml
	1 M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	23 ml

[0034] Eine erste Vorkultur (V = 20 ml) wurde über Nacht bei 30°C und 110 rpm inkubiert. Anschließend wurde die gesamte Vorkultur zum Animpfen der zweiten Vorkultur (V = 2 l) verwendet. Nach zwei Tagen Inkubation wurden 1,5 l der zweiten Vorkultur als Inokulum für die Fermentation (V = 20 l) genutzt. Da der Induktor Hydantoin während des Wachstums verbraucht wird, wurde dieses mit einer Förderpumpe kontinuierlich zudosiert, so dass die Hydantoinkonzentration im Medium konstant 0,2 g/l betrug. Nach der Zellernte wurden 205 g BFM aliquotiert und bei -20°C gelagert.

## II. Aufreinigung der D-Hydantoinase aus *Arthrobacter crystallopoietes* DSM 20117

[0035] Das Protokoll zur Aufreinigung der D-Hydantoinase aus *Arthrobacter crystallopoietes* DSM 20117 orientiert sich mit einigen Modifikationen an der von Marin (Doktorarbeit, Uni Stuttgart, 1997) beschriebenen Proteinaufreinigung der D-Hydantoinase. Die Aufreinigungsschritte wurden, wenn möglich, bei 4°C durchgeführt und die Bestimmung der Hydantoinaseaktivität der Fraktionen erfolgte zunächst im Schnelltest mit dem photometrischen Nachweis nach Ehrlich. Aliquots der positiven Proben wurden anschließend mit dem Standardsubstrat D,L-Benzylhydantoin inkubiert und die exakte Aktivität mittels HPLC bestimmt.

[0036] Die aus der Kultivierung erhaltene Biomasse (siehe I) von *Arthrobacter crystallopoietes* DSM 20117 wurde zunächst als 30%-ige Zellsuspension einem Glasperlensaftschluß in der Rührwerkskugelmühle unterzogen. Nach der Aufnahme einer Aufschlußkinetik, konnten nach 20 minütiger Aufschlußzeit Proteinkonzentrationen von bis zu 16,5 g/l erreicht werden. Danach wurden die Zelltrümmer sowie unlösliche Bestandteile durch Zentrifugation abgetrennt und der geklärte Überstand für die folgende Protaminsulfatfällung eingesetzt. Mit dieser ließ sich vor Durchführung einer Streamline-DEAE-Säulenchromatographie die Viskosität der Lösung verringern.

[0037] Die auf der Säule gebundenen Proteine wurden mittels eines Kochsalzgradienten eluiert. Die aktiven, gepoolten Streamlinefraktionen wurden mit einem gleichen Volumen 2 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Lösung versetzt, um sie anschließend mittels hydrophober Interaktionschromatographie (HIC) weiter aufzutrennen. Die Fraktionen mit der höchsten Hydantoinaseaktivität wurden anschließend vereinigt und über Anionenaustauschchromatographie an einer MonoQ-Säule von anderen Proteinen getrennt.

[0038] Die Daten zur Aufreinigung der Hydantoinase sind in Tabelle 2 zusammengefaßt, die SDS-PAGE der aufgereinigten D-Hydantoinase ergab ein Molekulargewicht von 50 +/- 5 kDa für dieses Enzym [10%-ige SDS-PAGE der aufgereinigten D-Hydantoinase nach Konzentrierung der MonoQ-Fraktionen, Molekulargewichtsmarker ProSieve und L-Hydantoinase aus *A. aureus* DSM 3745 als interner Standard von 49,7 kDa (May, Dissertation Uni Stuttgart, 1998)].



Tabelle 2

Aufreinigungsdaten für die D-Hydantoinase

Reinigung	Vol. [ml]	Prot. [g/l]	spez. Akt. [U/mg]	Reinigungs- faktor	Ausbeute [%]
Zellaufschluß	32	16	1,5	-	100
Protaminsulfat- fällung	29	17	1,4	0,9	89
vereinigte Streamlinefrakt.	61	3,8	1,9	1,3	57
Überstand Ammo- niumsulfatfällg.	120	1,5	3,7	2,4	85
vereinigte HIC- Fraktionen	30	0,8	13,3	8,8	41
vereinigte MonoQ-Fraktionen	19	0,4	30,1	19,8	29

## III. Tryptischer Verdau der D-Hydantoinase

[0039] N-terminale Sequenzierungen liefern sichere Sequenzergebnisse nur für die ersten 30 Aminosäuren. Die in der Arbeit von Marin angegebene Sequenz ließ eine Ableitung von Primern allerdings nicht zu. Daher mußte das Protein zur weiteren Sequenzinformation durch einen Proteaseverdau in mehrere Peptide zerteilt werden. Zur enzymatischen Fragmentierung wurde mit Trypsin eine Endopeptidase verwendet, die spezifisch nach den Aminosäuren Lysin und Arginin schneidet. Allerdings ist mit einer verminderten Aktivität zu rechnen, wenn eine saure Aminosäure folgt, und sogar mit einem Ausbleiben der Hydrolyse, wenn ein Prolinrest folgt. Bei einem durchschnittlichen Vorkommen von Lysin und Arginin von 5,7% bzw. 5,4% in Proteinen, ist bei vollständigem Verdau mit einer durchschnittlichen Peptidlänge von etwa 9 Aminosäuren zu rechnen. Die Auftrennung des Peptidgemisches erfolgte anschließend durch quantitative HPLC.

[0040] Um die Hydantoinase aus *Arthrobacter crystallopoietes* DSM 20117 mit Trypsin zu verdauen, wurde diese wie beschrieben bis zu den MonoQ-Fraktionen aufgereinigt, anschließend mit einem Amicon-Filter (cut-off 30 kDa) aufkonzentriert und mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Um sicher zu gehen, dass es sich bei dem Protein auch um die D-Hydantoinase handelte, wurde ein Teil des Geles über einen Western-Blot auf eine Membran transferiert, ausgeschnitten und N-terminal die ersten acht Aminosäuren bestimmt. Mit Ausnahme von Position 2 stimmten alle ermittelten Aminosäuren mit dem von Marin (Dissertation, Universität Stuttgart, 1997) bestimmten N-Terminus überein, sodass davon ausgegangen werden konnte, dass es sich bei dem hier isolierten Protein um dasselbe Enzym handelte, das von Marin bereits beschrieben und charakterisiert wurde.

[0041] Daraufhin wurde die Hydantoinase-Bande direkt aus dem Polyacrylamidgel der aufgetrennten MonoQ-Fraktionen ausgeschnitten und in situ nach Angaben des Herstellers (Sigma, Steinheim) tryptisch verdaut. Die Peptide wurden mit Acetonitril aus dem Gel extrahiert und mittels präparativer HPLC voneinander getrennt. Die Fraktionen wurden im Speed-vac eingetrocknet und anschließend N-terminal über Edman-Abbau sequenziert.

[0042] Insgesamt konnten zusätzlich zum N-Terminus neun Peptide eindeutig sequenziert werden. Eines der Peptidfragmente wies das Konsensusmotiv GXXDXHXXH der cyclischen Amidasen auf, das an der Bindung eines Zinkatoms im aktiven Zentrum beteiligt ist (Abendroth et al., Acta Cryst. 2000, D56, 1166–1169). Bei den Peptidsequenzen, die nicht mit einem Lysin (K) oder Arginin (R) enden, brach die Sequenzierung aufgrund technischer Probleme oder mangelnder Qualität bzw. Quantität der Proben frühzeitig ab.

## IV. Klonierung des hyu-Genclusters

1. Isolierung chromosomaler DNA aus *Arthrobacter crystallopoietes* DSM 20117

[0043] Die durch Kultivierung von *Arthrobacter crystallopoietes* DSM 20117 auf Lactatmedium gewonnene Biofeuchtmasse (siehe I) diente auch zur Isolierung chromosomaler DNA. Nach Zellysis und Aufreinigung mittels Cäsiumchlorid-Dichtegradientenzentrifugation konnte hochreine, genomische DNA isoliert werden. Die Qualität wurde durch Aufnahme eines Absorptionsspektrum geprüft, um auf diese Weise Kontaminationen mit Phenol ausschließen zu können.

nen. Die photometrisch bestimmte DNA-Konzentration betrug 60 µg DNA/ml.

[0044] Die cDNA wurde für einen Restriktionsverdau eingesetzt und als Matrize für PCRs verwendet.

## 2. PCR mit degenerierten Primern

[0045] Durch die Sequenzierung der aus dem tryptischen Verdau hervorgegangenen Peptide (siehe III) konnten zusätzlich zum N-Terminus der D-Hydantoinase weitere Sequenzinformationen gewonnen werden. Die Peptide wurden mit dem Programm ClustalX an die bekannte Proteinsequenz von *Agrobacterium* sp. IP I-671 angepaßt (Thompson et al. 1997, The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools, Nucleic Acids Research. 24, 4876-4882).

[0046] Um von den bekannten Peptidsequenzen degenerierte Primer abzuleiten, sollten Sequenzabschnitte von zwei Peptiden ausgewählt werden, die einen niedrigen Degenerierungsgrad in der Aminosäurezusammensetzung besitzen. Hierfür wurden die Peptide 61.61 und 73.31 ausgewählt. Der Primer 61.61a paart an den Plusstrang und der Primer 73.31b an den Minusstrang der DNA.

Tabelle 3

Konstruktion der degenerierten Primer

Peptid	abgeleitete DNA-Sequenz	Primer-name	Seq.
SLVMYETGVAEGK (61.61 Seq. 12)	5' -GT (AGCT) ATG TA (CT) GA (AG) AC (AGC) GG-3'	61.61a	10
QNMDYTLFEGK (73.31 Seq. 13)	5' -GT (AG) TA (AG) TCC AT (AG) TT (CT) TC-3'	73.31b	11

[0047] Um den Degenerierungsgrad des Primers 61.61a weiter zu reduzieren, wurde auf Basis der Datenbank CUTG die Häufigkeitsverteilung der Codons aus *Arthrobacter* sp. berücksichtigt (Nakamura et al., Nucl. Acids Res. 1999, 27, 292). Dadurch konnte an der Position 3 dieses Oligonucleotides das Basentriplett "GTA", aufgrund der niedrigen Wahrscheinlichkeit dieses Codons von 10,4% für die Aminosäure Valin, bei der Primerkonstruktion vernachlässigt werden.

[0048] Um die Länge des PCR-Amplikons abzuschätzen, wurde ein Alignment der beiden Primer an die D-Hydantoinase aus *Agrobacterium* sp. IP I-671 durchgeführt. Im Alignment beträgt der Abstand zwischen den beiden Oligos 69 Aminosäuren, sodass eine PCR mit den degenerierten Primern 61.61a und 73.31b zu einem PCR-Produkt von ca. 207 bp Länge führen sollte.

[0049] Die PCR wurde im Temperaturprofil nach dem Standardansatz bei einer Annealingtemperatur von 42°C angesetzt und bezüglich des Magnesiumgehaltes auf eine Konzentration von 2 mM optimiert. Der PCR-Ansatz wurde anschließend in einem 3%-igen Agarosegel aufgetrennt und die Größe der Banden mit der Bildanalysesoftware Imagemaster bestimmt (Molekulargewichtsmarker D-15 Firma Novex). Die Bande, die eine berechnete Größe von 218 bp besaß, wurde aus dem Gel eluiert und in den pCR TOPO BluntII-Vektor (Fig. 3) ligiert. Das erhaltene Plasmid wurde als pJW1 (Fig. 4) bezeichnet. Eine anschließende Sequenzierung des Vektors ergab Homologien zu bereits bekannten Dihydropyrimidinasen, sodass damit der erste DNA-Abschnitt auf dem Strukturgren der D-Hydantoinase kloniert vorlag.

## 3. Sequenzierung des hyu-Genclusters über Inverse PCR

[0050] Um weitere Sequenzinformationen von den flankierenden DNA-Bereichen zu erhalten, kam die Technik der inversen PCR (IPCR) zum Einsatz.

[0051] Zum Verdau genomischer DNA aus *Arthrobacter crystallopoietes* DSM 20117 fanden die Restriktionsenzyme BamHI, EcoRI, SacI, PstI, BglII, HindIII, SalI, MunI, und MluI Anwendung. Die Verdau wurde über ein 1%-iges Agarosegel aufgetrennt und mittels Southern-Blot auf eine Nylonmembran fixiert.

[0052] Zur Herstellung einer geeigneten Sonde wurde das MunI linearisierte Plasmid pJW1 (Fig. 4) über Nick-Translation (Nick-Translation Kit der Firma Roche Diagnostics) mit <sup>32</sup>P-α-ATP radioaktiv markiert und zur Hybridisierung mit dem Blot eingesetzt (Molekulargewichtsmarker MWM VII).

[0053] Aufgrund der aus dem Southern-Blot erhaltenen Größe der Hybridisierungssignale wurde bei der folgenden IPCR der genomische PstI-Verdau (ca. 2000 bp) als Matrize eingesetzt. Dazu wurde der Verdau auf einem Agarosegel aufgetrennt, im Bereich zwischen 1500 und 2800 bp aus dem Gel eluiert (Molekulargewichtsmarker MWM VII), anschließend religiert und mit MunI linearisiert. Aus der bekannten Sequenz des Hydantoinasegens konnten die Primer IPCR1+ (Seq. 3) und IPCR1- (Seq. 4) für die IPCR abgeleitet werden. Aus den Schmelztemperaturen der Oligos leitete sich die Annealingtemperatur von 60°C ab.

[0054] Es konnte eine einzige Bande als Amplikon generiert werden, die anschließend eluiert und in das TOPO-System (Fig. 3) kloniert wurde. Das entstandene Plasmid erhielt die Bezeichnung pJW2 (Fig. 1). Das nach der Sequenzierung von pJW2 rekonstruierte hyu-Gencluster enthält den offenen Leserahmen der D-Hydantoinase hyuH und einen Teil des offenen Leserahmens der D-Carbamoylase hyuC<sub>D</sub>.

[0055] Im nächsten Schritt sollte, ebenfalls über die Technik der IPCR, der vollständige Leserahmen der D-Carbamoylase kloniert werden. Hierzu konnten aus dem bekannten Sequenzabschnitt der D-Carbamoylase Restriktionsenzyme gefunden werden, die den Anforderungen der IPCR gerecht wurden und möglichst weit am 5'-Ende des D-Carbamoylasegens schneiden sollten. Schließlich wurde ein genomischer Verdau mit den Restriktionsenzymen SacI, NaeI, SfuI, NarI und SphI durchgeführt und nach der Auftrennung im Agarosegel auf eine Nylonmembran geblotet.

[0056] Als Sonde eignete sich das kleine Fragment eines NarI/BamHI Doppelverdaues von pJW1 (Fig. 4). Es wurde in einem Gel aufgetrennt, eluiert und anschließend mittels Nick-Translation (Nick-Translation Kit der Firma Roche Diagnostics) radioaktiv markiert und zur Hybridisierung eingesetzt.

[0057] Aufgrund der Hybridisierungssignale wählte man den religierten NarI-Verdau (1,4 kb) als DNA-Template für die zweite IPCR. Als Primer wurden die Oligos IPCR5+ (Seq. 5) und IPCR5- (Seq. 6) bei einer Annealingtemperatur von 57°C eingesetzt.

[0058] Die Bande wurde in den TOPO-Vektor (Fig. 3) kloniert und das entstandene TOPO-Plasmid als pRW (Fig. 2) bezeichnet. Nach der Sequenzierung des Inserts konnte das hyu-Gencluster soweit rekonstruiert werden, dass der Leserahmen der D-Carbamoylase vollständig vorlag.

#### V. Expression der D-Carbamoylase

[0059] Nach der abgeschlossenen Sequenzierung des hyu-Genclusters fand eine Untersuchung der DNA-Sequenz auf potentielle Leserahmen statt. Für den Translationsstart der D-Carbamoylase kommt dabei neben dem atg-Startcodon auch ein ungewöhnliches ttg-Startcodon in Betracht, wobei das letztere zu einem um fünf Aminosäuren verlängerten N-Terminus führt. Da trotz der Indizien kein eindeutiger Beweis für das Vorhandensein eines seltenen ttg-Startcodons erbracht werden konnte, wurden sowohl die ttg-, als auch die atg-D-Carbamoylase kloniert und bezüglich ihrer Expression und Aktivität in *Escherichia coli* getestet.

[0060] Dazu wurden die D-Carbamoylasen mittels PCR aus der genomischen DNA von *Arthrobacter crystallopoietes* DSM 20117 amplifiziert. Dabei kamen unterschiedliche Primerpaare zum Einsatz, sodass drei unterschiedliche D-Carbamoylasen kloniert werden konnten. Eine D-Carbamoylase mit atg-Startcodon ohne His-tag sowie zwei D-Carbamoylasen mit ttg-Startcodon. Eine davon mit, die andere ohne His-tag. Bei der Primerkonstruktion wurde das ttg-Basentriplett aus der *Arthrobacter*-Sequenz in *Escherichia coli* durch ein atg-Codon ersetzt (Tabelle 4).

Tabelle 4

Eigenschaften der verschiedenen Klone der D-Carbamoylase

Plasmidbezeichng.	pMW1 (Fig. 5)	pMW2 (Fig. 6)	pMW3 (s. Fig. 5)
Startcodon in <i>Arthrobacter</i>	ttg	ttg	atg
Primerpaar	K_DCn2/c2	K_DCn2/c3	K_DCn1/c2
N-Terminale Restriktions-site	NdeI	NdeI	NdeI
C-Terminale Restriktions-site	BamHI	BamHI	BamHI
His <sub>6</sub> -tag	ja	nein	nein

[0061] Die Amplikons wurden in den Vektor pCR TOPO BluntII (Fig. 3) kloniert und das entstandene Plasmid einem Doppelverdau mit den Restriktionsenzymen NdeI und BamHI unterzogen. Zur Subklonierung des entstandenen, 947 bp großen Fragmentes diente der Rhamnoseexpressionsvektor pJOE4036 (Fig. 7). Die Plasmide wurden in *Escherichia coli* JM109 transformiert, und die Zellen zu Beginn der exponentiellen Phase mit 0,2 g/l Rhamnose induziert.

[0062] Bei der atg-Startcodonalternative ist keine zunehmende Proteinbande auf Höhe der D-Carbamoylase (34 kDa) zu erkennen, während bei der D-Carbamoylase mit ttg-Startcodon eine deutliche Zunahme zu verzeichnen ist. Nach 20 Stunden Induktion nimmt die Intensität der rekombinanten Proteinbande allerdings wieder ab, was vermutlich auf einen proteolytischen Verdau des Proteins zurückzuführen ist.

[0063] Nach einem Zellaufschluß der beiden Klone mit dem Homogenisator konnte nur bei dem Klon mit ttg-Startcodon D-Carbamoylaseaktivität festgestellt werden, während die Aktivität für pMW3 unter der Nachweisgrenze blieb.

[0064] Die D-Carbamoylase liegt vorwiegend im Überstand vor. Mit Hilfe des Programms Image Master (Amersham Life Sciences, Freiburg) konnte das Molekulargewicht des exprimierten Proteins auf 34,6 kDa festgelegt werden. Dieses Molekulargewicht stimmt mit dem berechneten Wert der D-Carbamoylase mit His-tag (35,4 kDa) gut überein. Ebenfalls

mit Hilfe dieses Programms konnte ermittelt werden, dass sich der Anteil der D-Carbamoylase im Überstand auf 30% des Gesamtproteins beläuft. Nach der Aufnahme eines Expressionsprofils konnte festgestellt werden, dass das Expressionsmaximum nach einer Induktionszeit von ca. sechs Stunden erreicht wird. Auch die spezifische Aktivität weist zu diesem Zeitpunkt ihr Maximum (2 U/mg für DL-C-Phe) auf.

## VI. Aufreinigung der D-Carbamoylase

[0065] Um die D-Carbamoylase charakterisieren zu können, wurde diese aufgereinigt. Bei dem Aufreinigungsverfahren wurde zuerst Biomasse des entsprechenden rekombinanten *Escherichia coli* Stammes angezüchtet und die Zellsuspension mit dem Homogenisator aufgeschlossen (siehe II).

[0066] Anschließend wurde die im Überstand enthaltene D-Carbamoylase über Metallaffinitäts-chromatographie (Talonsäulen® von Stratagene) aufgereinigt. Durch Umpufferung in 0,1 KPP, pH 8,0, mittels Gelfiltration (mittels PD-10 Säulen von Pharmacia) wurde das im Elutionspuffer der Talonsäule enthaltene Imidazol entfernt. Die einzelnen Aufreinigungsschritte wurden mittels SDS-PAGE dokumentiert.

## VII. Charakterisierung der D-Carbamoylase

[0067] Für die Charakterisierung des so erhaltenen Enzyms wurde die homogen aufgereinigte D-Carbamoylase mit His-tag und ttg-Startcodon verwendet (pMW1 – Fig. 1). Das Enzym lag in 0,1 M KPP pH 8,0 vor.

### 1. Bestimmung des pH-Optimums

[0068] Zur Bestimmung des pH-Optimums der aufgereinigten D-Carbamoylase wurden Umsetzungen bei verschiedenen pH-Werten in einem Bereich von 6,5 bis 9,0 mit DL-C-Phenylalanin als Substrat bei 30°C durchgeführt. Um Konzentrationseffekte ausschließen zu können wurde die Pufferkonzentration bei allen verwendeten Puffern (Tris, Kaliumphosphat und Tris-Glycin) auf einen Wert von 100 mM eingestellt. Das Aktivitätsmaximum der D-Carbamoylase lag bei pH 8.

### 2. Temperaturstabilität

[0069] Um die Temperaturstabilität der D-Carbamoylase bei 4°C zu untersuchen wurde das Enzym in 0,1 M KPP bei pH 8,0 über einen Zeitraum von 4 Tagen im Kühlschrank gelagert und alle 24 Stunden ein Meßwert genommen. Bei dieser Temperatur beträgt die Halbwertszeit des Enzyms ungefähr 100 Stunden.

[0070] Um die Temperaturstabilität bei 20, 30 und 40°C zu ermitteln, wurde das Enzym für 40 min bei der jeweiligen Reaktionstemperatur inkubiert und alle 5 min die Aktivität bestimmt. Die Ergebnisse sind in Fig. 8 dargestellt.

### 3. Bestimmung des Temperaturoptimums

[0071] Um das Temperaturoptimum zu bestimmen, erfolgte die Umsetzung von D,L-Carbamoyl-Phenylalanin unter den Bedingungen des Standardassays bei unterschiedlichen Temperaturen. Das Optimum für die Reaktionstemperatur liegt bei etwa 30°C.

### 4. Bestimmung kinetischer Parameter

[0072] Zur Bestimmung von  $v_{\max}$  und  $K_m$  wurde die Reaktionsgeschwindigkeit  $v$  in Abhängigkeit von der Substratkonzentration aufgetragen. Der Verlauf für D-Carbamoyl-Tryptophan ist in Fig. 10 dargestellt. Die Berechnung der kinetischen Parameter erfolgte über das Programm Enzymfit (entwickelt am Institut für Bioverfahrenstechnik, Universität Stuttgart). Für D-Carbamoyl-Tryptophan beträgt der  $K_m$ -Wert 7,5 mM und  $v_{\max}$  2,4 U/mg. Die Reaktion kann dabei durch eine Michaelis-Menten-Kinetik beschrieben werden (siehe Gleichung 1).

Gleichung 1

Michaelis-Menten-Kinetik

$$r = \frac{r_{\max} \cdot [S]}{K_m + [S]}$$

$r_{\max}$  maximale Reaktionsgeschwindigkeit

$S$  Substratkonzentration

$K_m$  Michaelis-Menten-Konstante

### 5. Bestimmung des Molekulargewichtes

[0073] Die Bestimmung des Molekulargewichtes unter denaturierenden Bedingungen im SDS-Gel mit dem Programm Image Master (Amersham Life Sciences, Freiburg) ergab einen Wert von 34,6 kDa. Dieser Wert stimmt mit dem auf Basis der Aminosäuresequenz der D-Carbamoylase mit His-tag berechneten Wert (35,46 kDa) sehr gut überein. Um festzustellen, ob das Enzym im nativen Zustand im mono- oder oligomeren Zustand vorliegt, wurde mit dem homogen aufgereinigten His-tag-Enzym eine native Gelelektrophorese bei einer Acrylamidkonzentration von 7,5 Gew.-% durchgeführt.

Bei dieser Konzentration liegt der lineare Bereich der Auftrennung zwischen 16 und 91 kDa. Nach einer Kalibrierung des Gels mit dem Proteinmarker ProSieve wurde die Molekülgröße der D-Carbamoylase mit dem Programm Imagemaster auf 75 kDa bestimmt. Demzufolge scheint das Enzym im nativen Zustand als Dimer vorzuliegen.

#### 6. Cofaktorabhängigkeit

[0074] Bei einer Inkubation der aufgereinigten D-Carbamoylase bei 25°C und in Gegenwart von 10 mM EDTA konnte keine Inaktivierung des Enzyms festgestellt werden. Allerdings konnte innerhalb von weniger als zwei Stunden eine vollständige Inhibierung des Enzyms beobachtet werden, wenn es mit 10 mM 8-Hydroxyquinolinsulfonsäure (8-HQSA) inkubiert wurde. Um die Inaktivierung durch den Komplexbildner von der thermischen Inaktivierung unterscheiden zu können, wurde ein Aliquot der Enzymlösung ohne 8-HQSA mit inkubiert und die Aktivität über die Zeit verfolgt. Aussage? Um das Enzym zu reaktivieren, musste die 8-HQSA durch Gelfiltration von dem Enzym entfernt, und in Gegenwart von 2 mM Metallionen inkubiert werden. Weder  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  noch  $\text{Zn}^{2+}$  führte jedoch zu einer Reaktivierung des Enzyms.


[0075] Sulfhydrylreagenzien (Iodacetat, 2-Nitrobenzoat und para-Chlor-Quecksilberbenzoat), die dem Enzym in Konzentrationen von 1 mM zugesetzt wurden, führten zu einer vollständigen Inaktivierung der D-Carbamoylase.

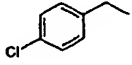
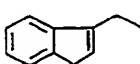
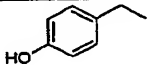
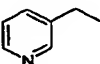


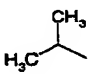


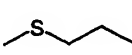
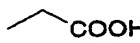
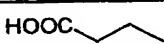
#### 7. Substratspezifität

[0076] Zur Bestimmung des Substratspektrums inkubierte man das Enzym bei einer Reaktionstemperatur von 30°C mit dem jeweiligen Substrat in Gegenwart von 0,1 M Kaliumphosphatpuffer pH 8,0. Um eine gleich hohe Konzentration des D-Isomers zu gewährleisten, wurde bei Vorliegen des Substrates als Isomerengemisch eine Konzentration von 20 mM eingestellt; lag das Substrat als reines Isomer vor, wurde eine Konzentration von 10 mM eingestellt. D,L-Carbamoyl-Phenylalanin diente dabei als Referenzsubstrat und wurde bei der Berechnung der relativen Aktivitäten auf 100% (entspricht 2 U/mg) gesetzt. Es wurden die in Tabelle 5 mit Strukturformeln dargestellten Carbamoylsubstrate mit den jeweiligen Aktivitäten umgesetzt. Die D-Carbamoylase aus *Arthrobacter crystallopoietes* DSM 20117 ist in der Lage, Carbamoylverbindungen mit aliphatischen und mit aromatischen Resten umzusetzen, wobei letztgenannte schneller umgesetzt werden. Charakteristisch für die gefundene D-Carbamoylase ist beispielsweise die deutliche Präferenz für das Substrat D-Carbamoyl-Alanin, das mindestens fünfmal besser umgesetzt wird als alle anderen Substrate. Als einziges achirales Substrat unter den getesteten Verbindungen wird Carbamoyl-Glycin mit ähnlichen Reaktionsraten umgesetzt wie die Carbamoyl-Aminosäuren mit aliphatischen Resten.

Tabelle 5

Strukturformeln, Abkürzungen und relative Umsätze der Substrate der D-Carbamoylase

Substrat	Formel des Aminosäurerestes	Abkürzung	rel. Akt. [%]
D, L-Carbamoyl-Phenylalanin		D, L-C-Phe	100
D-Carbamoyl-Phenylalanin	siehe D, L-C-Phe	D-C-Phe	115

Substrat	Formel des Aminosäurerestes	Abkürzung	rel. Akt. [%]
L-Carbamoyl-Phenylalanin	siehe D,L-C-Phe	L-C-Phe	0
D,L-Carbamoyl-para-Chlor-Phenylalanin		D,L-p-Cl-C-Phe	19
D-Carbamoyl-Tryptophan		D-C-Phe	80
D,L-Carbamoyl-Tyrosin		D,L-C-Tyr	63
D,L-Carbamoyl-Pyridylalanin		D-C-Pal	43
D-Carbamoyl-Alanin		D,L-C-Ala	510
Carbamoyl-Glycin		C-Gly	27
D,L-Carbamoyl-Valin		D,L-C-Val	31
D,L-Carbamoyl-Serin		D,L-C-Ser	35
D,L-Carbamoyl-tert-Leucin		D,L-C-tLeu	18
D,L-Carbamoyl-Methionin		D,L-C-Met	13
$\beta$ -Ureidopropionat		$\beta$ -UP	0
$\beta$ -Ureidosuccinat		D,L-C-Asp	0

[0077] Auch Aminosäuren mit unnatürlichen Resten, wie beispielsweise D,L-para-Chlor-Phenylalanin, D,L-Carbamoyl-tert-Leucin oder D,L-Carbamoyl-Pyridylalanin, können nach der Umsetzung der entsprechenden Substrate als Reaktionsprodukt nachgewiesen werden.

[0078] Beim Vergleich der Umsetzung von D,L-, D- und L-Carbamoyl-Phenylalanin läßt sich erkennen, dass das Enzym für dieses Substrat enantiospezifisch ist und dass das racemische Gemisch reproduzierbar langsamer umgesetzt wird, als das reine D-Isomer. Somit scheint das L-Isomer bei Konzentrationen von 10 mM einen leichten inhibitorischen Effekt auf die Enzymkatalyse zu haben, da in den Ansätzen mit D- bzw. D,L-Carbamoyl-Phenylalanin die gleiche Konzentration des D-Isomers vorlag.

[0079] Auch andere reine L-Carbamoyl-Aminosäuren wie L-Carbamoyl-Valin oder L-Carbamoyl-Tryptophan wurden nicht umgesetzt.

[0080] Außerdem wurden  $\beta$ -Ureidopropionat und  $\beta$ -Ureidosuccinat (D,L-Carbamoyl-Aspartat) als mögliches physiologisches Substrat getestet. Beide Verbindungen werden unter den gewählten Assaybedingungen nicht umgesetzt.

1. D-Carbamoylase aus *Arthrobacter crystallopoietes* DSM 20117.
2. Gensequenzen codierend für eine D-Carbamoylase nach Anspruch 1.
3. Plasmid oder Vektor aufweisend eine Gensequenz nach Anspruch 2. 5
4. Mikroorganismus aufweisend eine Gensequenz nach Anspruch 2.
5. Primer zur Herstellung der Gensequenzen nach Anspruch 2 mittels PCR.
6. Verwendung einer D-Carbamoylase gemäß Anspruch 1 zur Herstellung von enantiomerenangereicherten Aminosäure.
7. Verwendung nach Anspruch 6 dadurch gekennzeichnet, daß man Hydantoine im System Hydantoinase/D-Carbamoylase ggf. in Gegenwart einer Hydantoinracemase oder einem zur Racemisierung von Carbamoylamino-säuren befähigten Enzym umsetzt. 10
8. Verwendung einer D-Carbamoylase gemäß Anspruch 1 oder der Gensequenz nach Anspruch 2 zur Herstellung gentechnisch veränderter Enzyme.
9. Verfahren zum Auffinden eines chromosomal codierten Gens, welches für ein Enzym codiert, das in einem Verfahren zur Herstellung von D-Aminosäuren aus 5'-substituierten Hydantoinen mitwirken kann, wobei man 15
  - a) chromosomale DNA eines Organismus, welcher befähigt ist, D-Aminosäuren aus 5'-substituierten Hydantoinen herzustellen, in Bruchstücke teilt,
  - b) diese anschließend in Plasmide kloniert,
  - c) die Plasmide mit Oligonucleotiden hybridisiert, welche die Sequenzinformation einer Hydantoinase oder einer D-Carbamoylase aufweisen, 20
  - d) ausgehend von der erfolgreichen Hydantoinase-Hybridisierung D-Carbamoylasesequenzen oder im Falle der erfolgreichen D-Carbamoylase-Hybridisierung Hydantoinasesequenzen im gleichen Plasmid identifiziert.
10. Verfahren zur Herstellung von Enzymen gemäß einem Verfahren nach Anspruch 9.
11. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß man ein Enzym nach Anspruch 1 herstellt. 25

---

Hierzu 8 Seite(n) Zeichnungen

---

30

35

40

45

50

55

60

65

- Leerseite -



Fig. 1

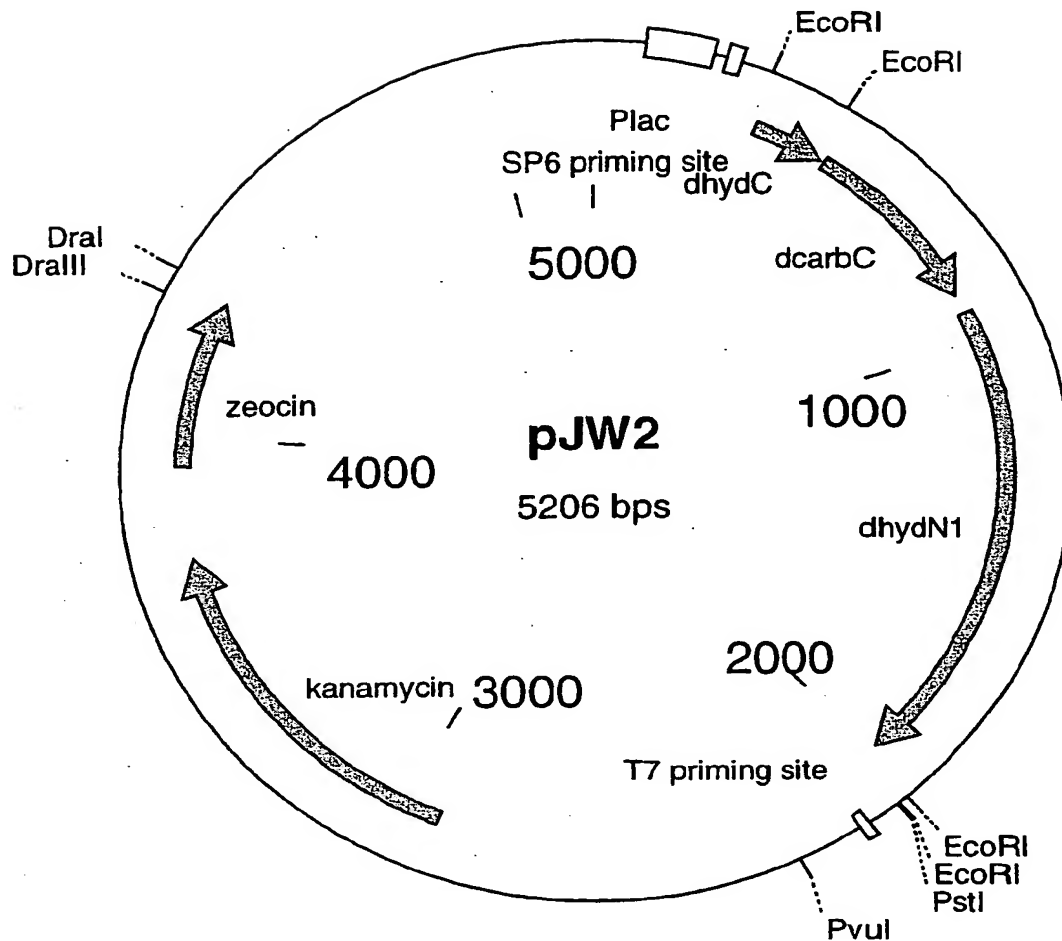


Fig. 2

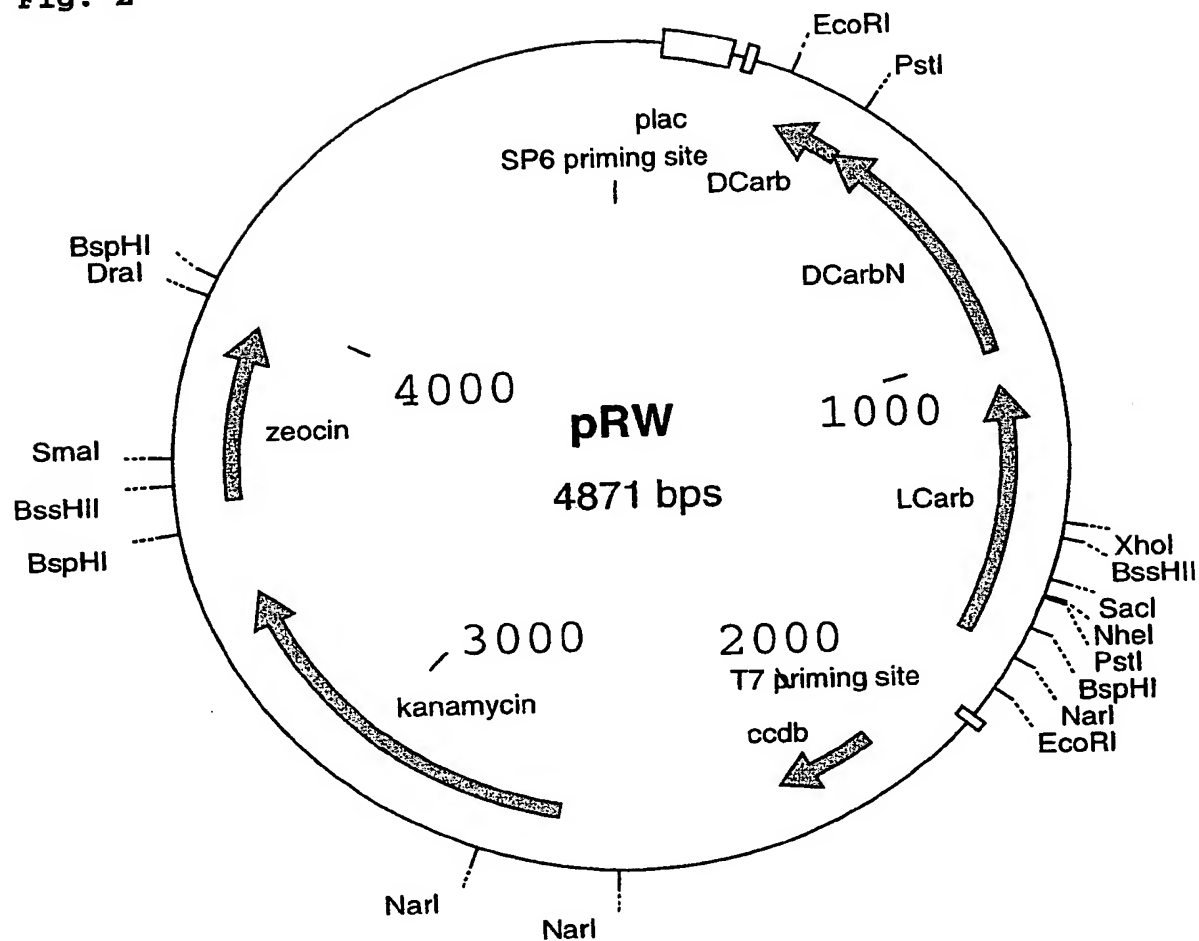
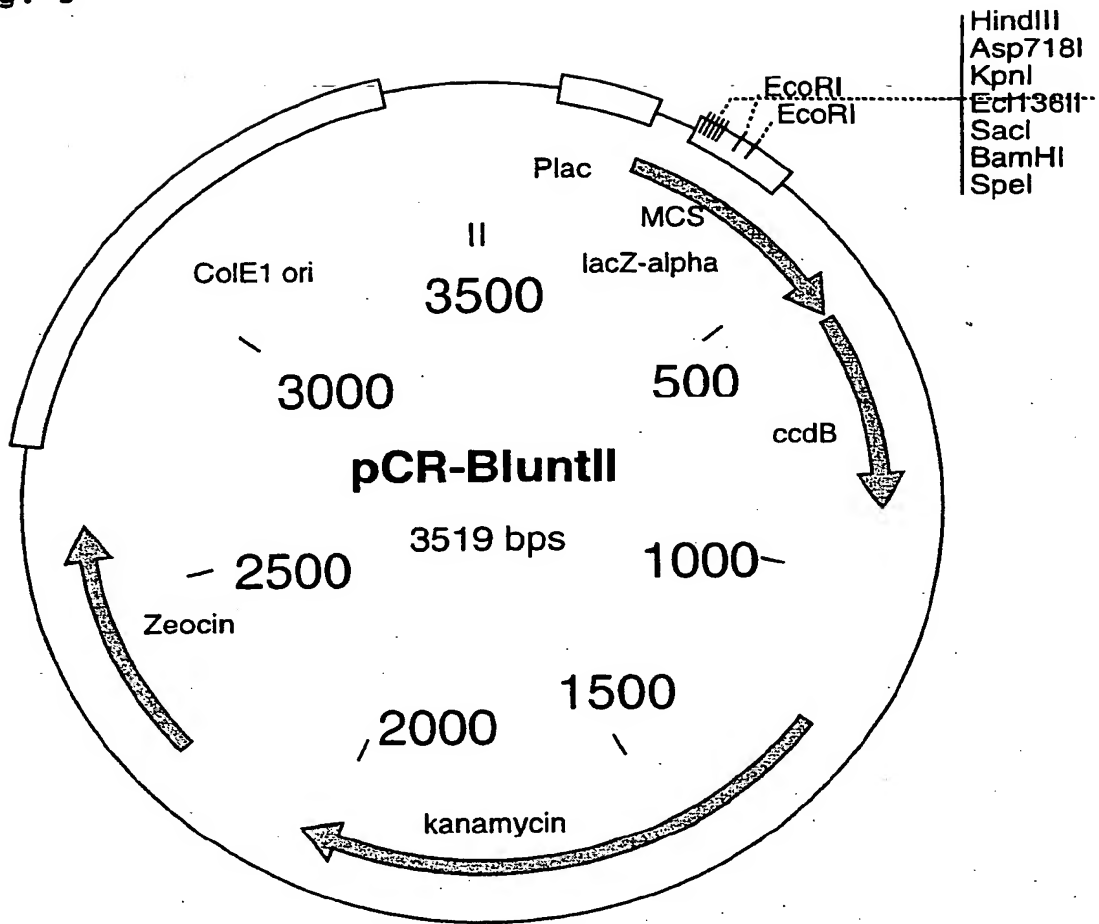


Fig. 3



**Fig. 4**

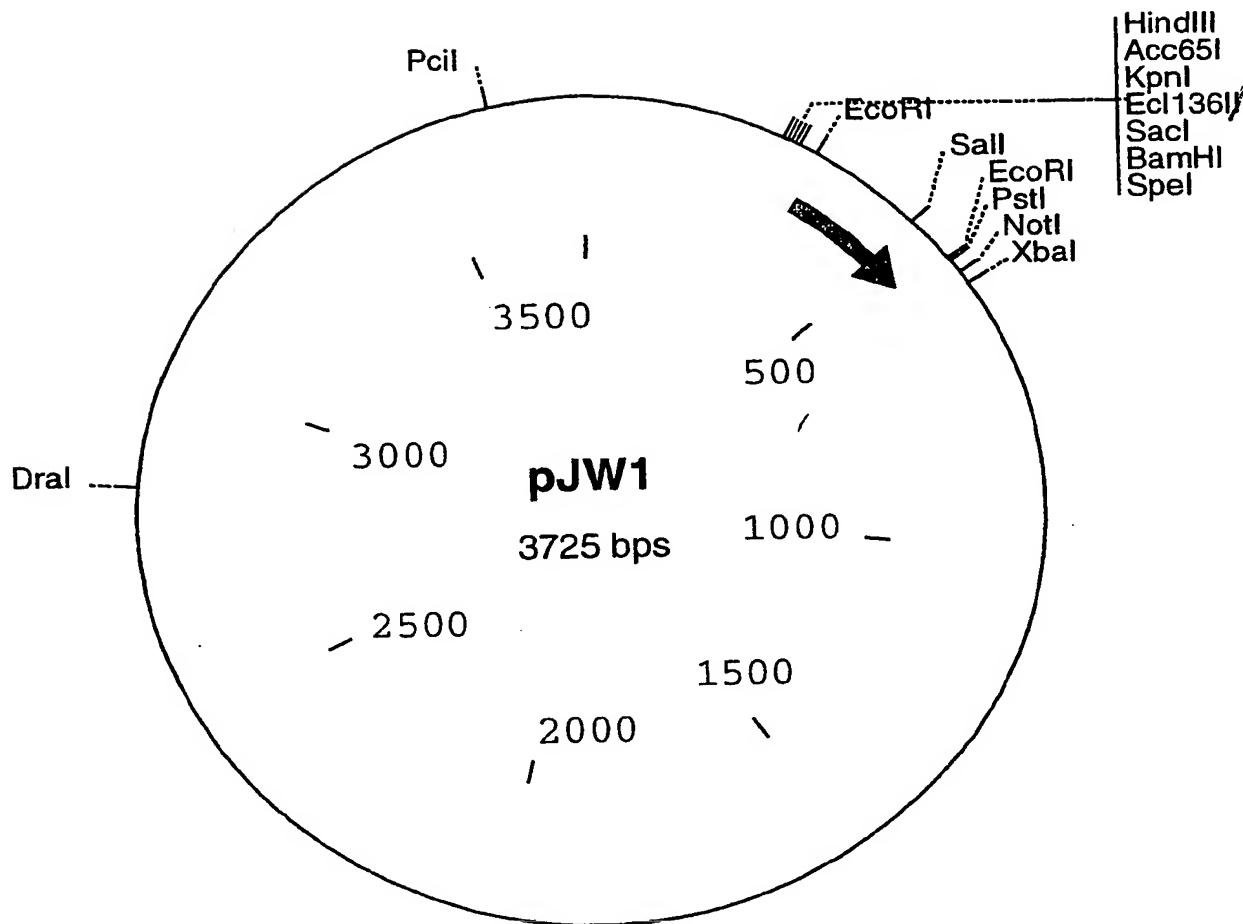


Fig. 5

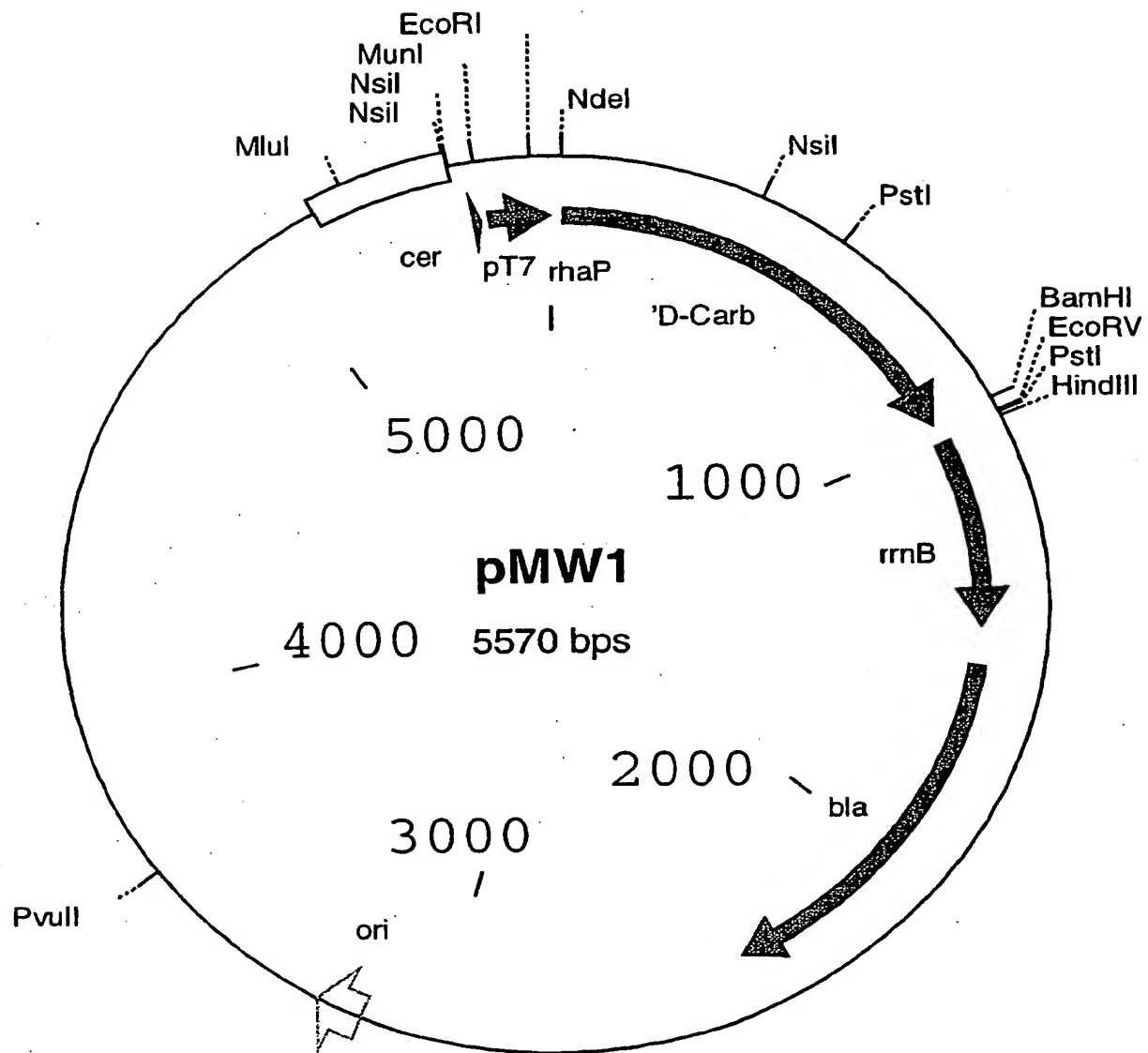


Fig. 6

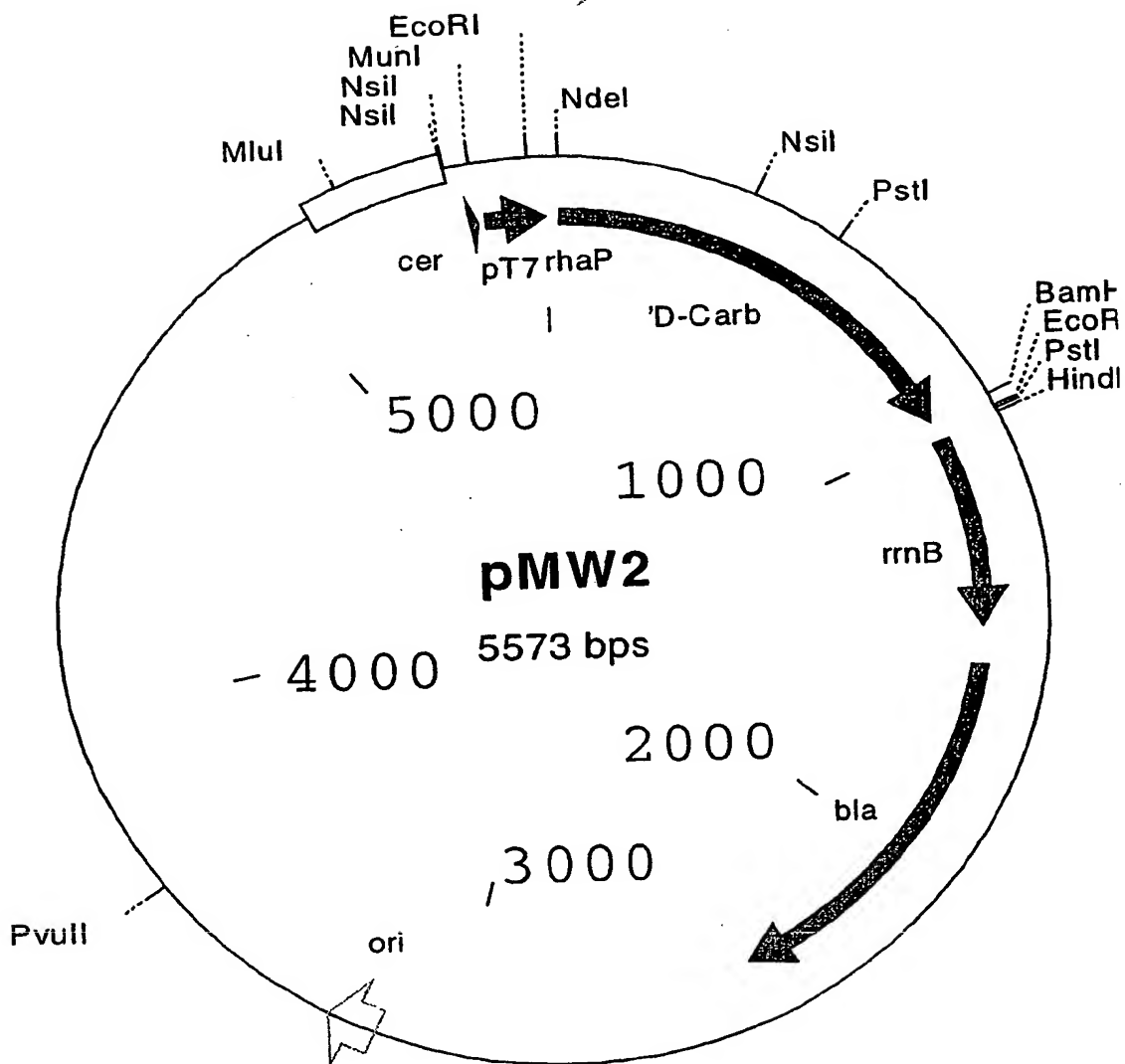


Fig. 7

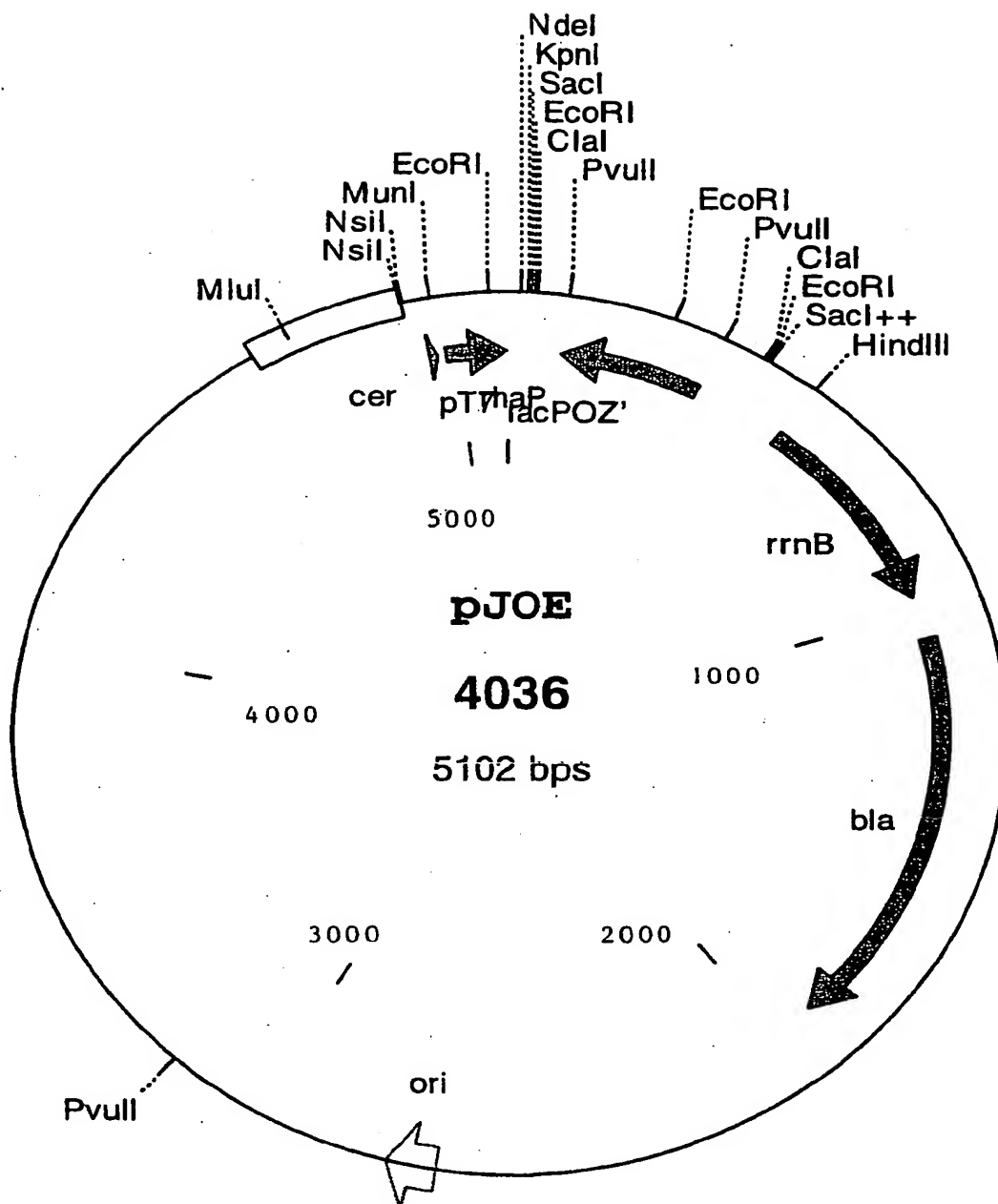


Fig. 9:

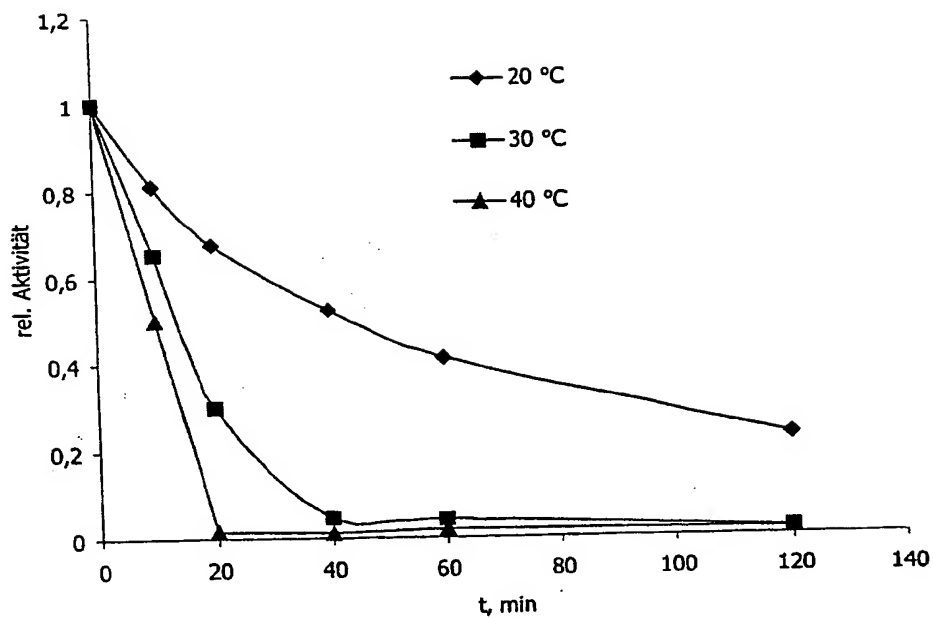


Fig. 10

